

OTIMIZAÇÃO DE VEÍCULO FARMACÊUTICO TÓPICO CONTENDO AZUL DE METILENO PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Lucas A. G. da Costa^{1*}, Juliana S. A. Falcão¹, Luíza B. M. Santos¹, Adriana Fontes², Beate S. Santos¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE

²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE

*lucas.amadeu@ufpe.br

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TDF) é definida como uma terapia que utiliza reações fotoquímicas para destruição seletiva de tecido ou células. É uma técnica terapêutica de dois estágios no qual o uso de uma droga sensibilizadora tópica ou sistêmica é seguido pela irradiação de luz visível. Os fotossensibilizadores, administrados de forma exógena ou formados endogenamente, são ativados pela luz e transferem sua energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) que induzem morte celular, como esquematizado na Figura 1.

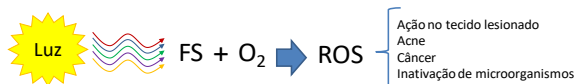


Figura 1 - Esquema geral da Terapia Fotodinâmica, onde FS = fotossensibilizador, ROS = espécie reativa de oxigênio.

A Figura 2 apresenta um esquema geral que ilustra os diferentes processos que ocorrem a partir da excitação de um fotossensibilizador por uma fonte de luz. A absorção de um fóton de luz promove a excitação e transição do FS do estado fundamental para o estado excitado singlete. Neste estado, o FS pode regressar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou passar ao estado excitado tripleto onde pode reagir com o oxigênio molecular de duas formas distintas (reação tipo I e reação tipo II). Na reação do tipo I, o FS reage diretamente com o substrato, membrana celular ou uma molécula, essa reação permite a transferência de elétrons (e^-) formando íons ou radicais derivados do FS e do substrato. As espécies reativas são formadas por reduções de um ou mais elétrons no oxigênio (O_2). Os produtos desta redução incluem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical alcoxila, radical peroxila e radical hidroxila (OH^\cdot).

Os FS podem ser administrados por várias vias, sendo a via tópica uma alternativa para o tratamento de micoses, cânceres de pele, infestações parasitárias ou infecções bacterianas. Apesar de ter um campo de ação visível, tal via também apresenta uma grande complexidade para a ação fototerápica, tais como: as características ópticas do tecido, os processos de reflexão, absorção, espalhamento de luz e o estado funcional do tecido. Como exemplo, a pele escura absorve mais luz no visível em comparação à pele clara devido a maior quantidade de melanina, um dos principais cromóforos do tecido biológico. No caso de lesões, a penetração da luz é maior se comparada à pele normal de espessura similar. Para isso, é necessário o desenvolvimento de formulações

farmacêuticas capazes de veicular os FS ao local acometido pela lesão tecidual, levando em consideração as propriedades ópticas do tecido-alvo.

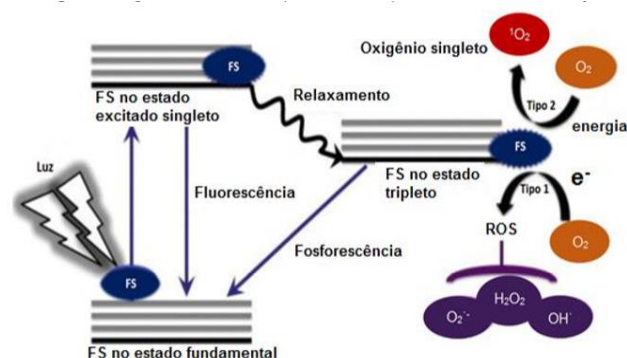


Figura 2 - Esquema ilustrando os possíveis processos durante a terapia fotodinâmica com o processo de excitação do FS e formação de ROS. [Fonte: Adaptado de TEGOS et al (2012); COSTA (2013); VIANA (2015)].

Neste sentido, este trabalho visa o desenvolvimento de uma formulação simples na forma gel para incorporação de fotossensibilizadores com a finalidade de aplicação em terapia fotodinâmica. Os géis são sistemas semissólidos nos quais o movimento do meio dispersante é restrito por uma rede tridimensional de partículas interligadas ou macromoléculas solvatadas presentes na fase dispersa. Pode estar envolvido um alto grau de interações físicas ou químicas. O aumento da viscosidade causado pelo entrelaçamento e consequente atrito interno é responsável pelo estado semissólido. Um gel pode consistir de filamentos torcidos e emaranhados que geralmente se mantêm unidos por ligações do tipo Van der Waals, formando regiões cristalinas e amorfas ao longo do sistema.

O azul de metileno (AM) é um corante catiônico e que por ser relativamente lipofílico, capaz de permear membranas e por possuir carga positiva é atraído pelo potencial negativo das mitocôndrias, podendo atuar nesta organela. Este FS é atualmente empregado no tratamento de infecções bucais, periodontite e descontaminação endodôntica. Ele possui ainda, boa eficácia de geração de 1O_2 , em torno de 50%. Sua estrutura molecular está representada na Figura 3. A Figura 3 mostra a aplicação de azul de metileno (em solução aquosa) no tratamento de periodontite.



Figura 3 - Aplicação de terapia fotodinâmica no tratamento de periodontite utilizando-se o fotossensibilizador azul de metileno em solução aquosa e fonte de luz vermelha. (Fonte: www.researchgate.net/figure/223961765_fig1_Patient-with-chronic-periodontitis-before-treatment-left-during-photodynamic-therapy).

MATERIAIS E MÉTODOS

Formulações a base de gel carbopol 940® (Figura 4) foram preparadas contendo FS na concentração 5×10^{-6} mol.L⁻¹ (SANTOS, 2016).

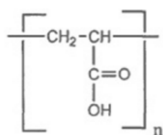


Figura 4 - Monômero do Carbopol 940.

A detecção de ROS do FS foi então avaliada antes e após incorporação ao gel, através do método químico indireto empregando-se agentes químicos N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e L-histidina (KRAJLIC & MOHSNI, 1978). O método consiste na análise do padrão de degradação do RNO a partir do intermediário altamente reativo gerado pelo ataque do ROS a L-histidina. A produção de ROS equivale à queda na densidade óptica do RNO, dessa forma a quantificação de ROS foi avaliada a partir do coeficiente angular da reta, e percentual de produção de ROS calculado a partir das Equações:

$$RNOc = \frac{ABS_i \times 100}{ABS_f} \quad ROSp = 100 - RNOc$$

Onde:

RNOc = percentual de RNO consumido

ABS_i = absorbância inicial do fotossensibilizador

ABS_f = absorbância final do fotossensibilizador

ROSp = percentual de produção de ROS

A geração de ROS foi induzida irradiando-se com laser (660 nm) as formulações contendo AM (solução e gel), durante o período de 0 a 5 minutos, sendo a análise feita a cada 20 s ou a cada 1 min. Espectros de absorção eletrônica foram registrados entre 350 e 450 nm (espectrofotômetro modelo Lambda 650 UV/Vis, Perkin Elmer da Central Analítica do Depto. Química Fundamental, UFPE). A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zanin et al. (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de varredura completa dos espectros dos componentes do estudo de detecção de ROS (de 200 a 900 nm) confirmaram que não houve interferência na análise do resultado da leitura do RNO, conforme visto na Figura 5.

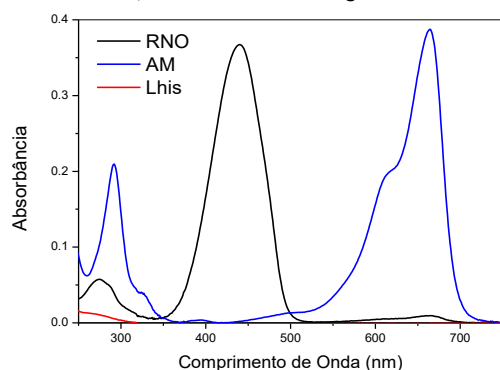


Figura 5 - Espectros de absorção dos componentes do método de ROS. Não há interferência entre os componentes (RNO, L-histidina e AM).

Os primeiros resultados foram obtidos em solução, pleiteando que o ROS foi gerado e que o RNO captou tal geração a partir de sua degradação (Figura 6). A degradação foi feita, inicialmente, com o intervalo de 20 s entre cada leitura, até totalizar 5 min. Ocorreu uma queda na taxa de degradação ao longo do tempo. É interessante reparar na existência de um ponto isobéstico ($\lambda = 380$ nm), ponto onde a absorção de duas ou mais espécies é a mesma, o que sugere a existência de um produto de degradação do RNO com absorção próxima.

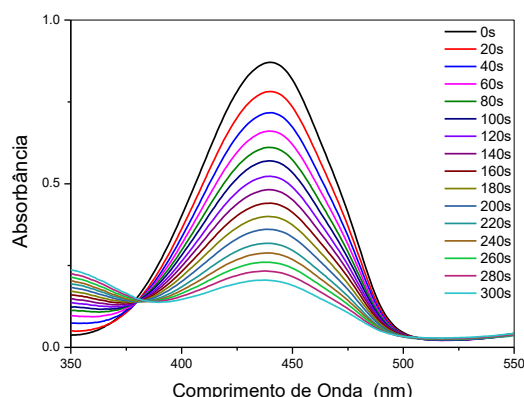


Figura 6 - Curvas de degradação do RNO ao longo dos 5 min de irradiação ($\lambda = 660$ nm) com um intervalo de 20 s entre cada irradiação da solução contendo AM ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

O principal resultado obtido a partir dessa análise foi que o intervalo de irradiação da amostra interfere na geração de ROS, como visto na Figura 7: se o intervalo de exposição for de 1 min, a taxa de degradação é menor (65%) do que se for com intervalos de 20 s (75%). Isto decorre provavelmente de variações de concentração das espécies reativas de oxigênio formadas durante a irradiação do AM e a presença de O₂ no meio. O fato do sistema ser homogeneizado a cada 20 s pode estar favorecendo o processo, através do maior contato da solução com o ar.

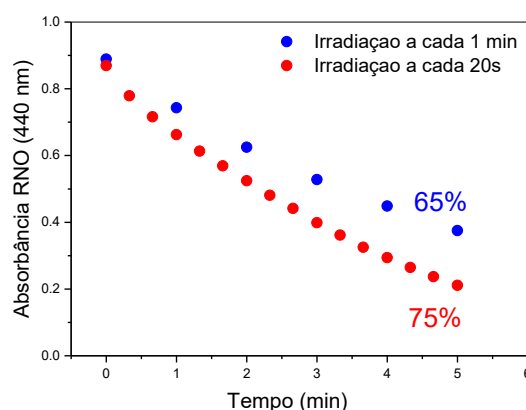


Figura 7 - Curvas com o valor da absorbância em 440 nm indicando a degradação do RNO em duas situações de irradiação do laser ($\lambda = 660$ nm): a cada 1 min (●) e a cada 20s (●).

Após a preparação dos géis observou-se que não houve alteração macroscópica significativa na forma semissólida após sua incorporação. Os géis (placebo, gel/AM) demonstraram pH em torno de 6,0, viscosidade 2×10^6 cP e espalhabilidade máxima de 4032-4808 mm² nas condições de estudo confirmando que a baixa concentração não modificou as propriedades gerais do gel.

No entanto, foi observado que a resposta da produção de ROS do AM é reduzida em torno de 25% após sua incorporação no gel, quando comparada à produção em solução aquosa. As hipóteses para o decaimento da geração de ROS do AM na formulação em gel podem estar atribuídas às interações intermoleculares ou a auto supressão de fluorescência. A molécula de azul de metileno com

carga levemente positiva (Figura 3) tem possibilidade de interagir com a malha polimérica do gel carbopol (poliânion). Esta interação supramolecular pode levar à uma mobilidade menor das moléculas deste FS, reduzindo a seção de choque com o oxigênio livre dissolvido no meio aquoso. Outra possibilidade é no gel, as moléculas podem sofrer um adensamento local das espécies de AM. Ou seja, uma concentração de espécies de AM pode causar um efeito conhecido como auto-supressão durante sua irradiação com luz. Isto fica ainda mais complexo quando se observa o espectro de absorção e o de emissão do AM onde se evidencia um pequeno deslocamento de Stokes e uma região espectral de grande superposição da banda de absorção e a de emissão. Assim, ao emitir luz quando irradiado pode ocorrer a absorção desta luz pelo próprio AM, reduzindo sua eficiência para geração de ROS. Estas possibilidades serão testadas realizando-se estudos da dependência da concentração da espécie na formulação semissólida com a eficiência de produção de ROS.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados pode-se concluir que a incorporação do FS não alterou de modo microscópico as características do gel, bem como seu pH. Nos testes prévios realizados em solução observou-se que uma exposição mais prolongada da fonte de luz diminui a taxa de geração de ROS, o que sugere que o tempo entre uma exposição e outra é fundamental na cinética da reação. É esperado que a taxa de geração de ROS seja alterada pela presença do gel, já que a mobilidade das moléculas do ativo, bem como a penetração de luz muda o padrão observado.

REFERÊNCIAS

- COSTA, L. D. S. Síntese e Caracterização de Porfirinas como Potenciais Agentes Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica. Dissertação - Mestrado, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- SANTOS, L.B.M., Incorporação de Zincoporfirina e Azul de Metileno em Gel e Avaliação Para Uso em Terapia Fotodinâmica. Dissertação de Mestrado, Ciências Farmacêuticas, UFPE, 2016.
- KRALJIC, I, MOHSNI, S. E. A New Method for the Detection of Singlet Oxygen in Aqueous Solutions. *Photochem. Photobiol.* 28, 577-581, 1978.
- TEGOS, G., et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology* 3, 120, 2012.
- VIANA, O. S. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados à base de quantum dots livres e associados à porfirinas para aplicação em sistemas biológicos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2015.
- ZANIN, S. M. W. et al. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. *Revista Visão Acadêmica*, Curitiba, 2, p. 47-58, 2001.